

博士論文審査報告書

氏名	永井 陽久
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	博理第132号
学位授与報告番号	甲第419号
学位授与年月日	令和3年6月30日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当
論文題名	Analysis of quantitative regulation of individual tRNA species to maintain the tRNA repertoire 「tRNA レパートリーを形成する tRNA 種毎の量的制御機構の解析」
論文審査委員	(主査) 教授 吉田 秀郎 (副査) 教授 西谷 秀男 (副査) 教授 吉久 徹 (副査) 教授 今高 寛晃 (兵庫県立大学大学院工学研究科、教授)

1. 論文内容の要旨

mRNA におけるコドンの選択と tRNA の供給は、プロテオームの形成を左右する重要な翻訳パラメーターである。以前、個々の tRNA 種の量はそれらをコードする遺伝子の数には左右されるものの、生物の一生を通じて大きくは変化しないと考えられてきた。しかし、近年の研究によって tRNA の発現パターン (tRNA レパートリー) は、細胞内外の環境によって変化することが明らかとなってきた。こうした事実は、サイトゾル中の tRNA 濃度を正しく測定することの重要性を改めて示すものとなった。microarray や RNA-seq といった網羅的な RNA 解析手法は、個々の tRNA 種の量が細胞を巡る環境変化でどう変わるかを知るには有用である。しかし、これらの手法は、各 tRNA 種がどれほどの効率でシグナルを生むかのアセスメントができないため、異なる tRNA 種間の量比を正しく見積もるには不向きである。従って、tRNA レパートリーを完全に理解するためには、十分な RNA 種分解能を持ち、かつ、信頼できる tRNA 絶対定量法を新たに開発する必要があった。さらに、環境変化に伴う tRNA レパートリーの変化が積極的な制御に基づくならば、tRNA の合成、即ち、転写は重要な制御点である。しかし、RNA polymerase II で転写される mRNA の場合と異なり、RNA polymerase III で転写される tRNA 遺伝子の転写制御に関しては、いわゆるレポーター系の構築が難しく、研究が進んでいなかった。このように、tRNA レパートリーの理解のためには、技術的に解決すべき問題が複数存在していた。

本学位論文で申請者は、こうした tRNA レパートリーの研究において、新規解析手法の開発という側面から取り組んだ。まず、申請者は Oligonucleotide-directed Three-prime Terminal Extension of RNA 法 (OTTER 法) という新規の tRNA 絶対定量法を開発した。この方法はアンチコドンで分類される tRNA (isoacceptor tRNA) レベルの種分解能で、tRNA 分子を特異的に蛍光標識・定量する手法である。標識された tRNA 分子は元の tRNA より伸張されるので、標識反応後のサンプルを northern blotting で分析することで標識効率を個々に評価することができる点が、この手法の特色である。申請者はこの手法を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に適用し、42 種類存在するサイトゾルの tRNA を 34 の個別 isoacceptor tRNA と 4 組の同じアミノ酸に対応した isoacceptor tRNA ペアの合算として定量できる条件を整え、いくつかの

生理的生育条件下においてその絶対量を測定した。この手法により、標準的な *S. cerevisiae* 用の培地である YPD 中で対数増殖期まで培養した出芽酵母は、 0.030 ± 0.002 pmol/ μ g RNA から 0.728 ± 0.044 pmol/ μ g RNA の幅の isoacceptor tRNA を含むことを明らかにした。また、培地の炭素源や培養ステージによって出芽酵母の tRNA レパートリーが isoacceptor tRNA レベルで制御されている可能性等を見出した。

次に申請者はこうした tRNA レパートリー形成の要となる tRNA 種毎の転写制御を解析する手法の開発に取り組んだ。tRNA 遺伝子は内部プロモーターを持ち、転写後の修飾過程に至るまで mRNA 遺伝子とは大きく異なる。従って、単に tRNA 遺伝子にレポータータンパク質の遺伝子を融合することで tRNA のプロモーター活性を調べることはできない。そこで、申請者は CRISPRi システムを用いて、tRNA プロモーター活性を測定する手法の開発に取り組んだ。CRISPRi では、標的遺伝子を認識する sgRNA とこの sgRNA と結合して RNA polymerase 等の働きを阻害する dCas9 タンパク質が協働する事で、標的遺伝子の転写が抑制される。申請者は、 β -galactosidase 遺伝子を標的とする sgRNA を tRNA 遺伝子の 3'末端に結合した融合遺伝子を作成し、tRNA プロモーターの強さを、この sgRNA の発現量で決まる β -galactosidase 遺伝子の転写抑制で見積もる系を開発した。実際、sgRNA の発現度合いにある程対応した β -galactosidase 活性の低下、即ち、レポーターの転写抑制が見られることを明らかにし、tRNA プロモーターの強さの定量解析に道を拓いた。なお、本論文中的新規 tRNA 絶対定量法の開発・応用の部分は、国際 RNA 学会の学会誌 *RNA* に掲載された [Nagai, A., Mori, K., Shiomi, Y., and Yoshihisa, T. (2021) OTTER, a new method quantifying absolute amounts of tRNAs. *RNA*, 27: 628-640. doi: 10.1261/rna.076489.120]。

2. 論文審査結果

tRNA は長らく存在量があまり変化しないハウスキーピング因子だと考えられていたが、近年の研究でそのレパートリーが細胞の内的・外的環境に応じて変化することが明らかとなってきた。こうした研究では microarray や RNA-seq 等といった網羅的 RNA 解析手法が利用されてきたが、現在でも tRNA 種間で測定手法のシグナル生成に対するバイアスが大きいこと、さらには、個々の tRNA 種の測定におけるバイアスの強さを正確に評価し難いことは問題視されている。永井陽久氏はこうしたことから、tRNA レパートリーの真の姿を明らかにする目的で、新規な tRNA の絶対定量法の開発に取り組み、OTTER 法の確立を成し遂げた。OTTER 法は、tRNA を reverse primer extension によって蛍光標識する際に数ヌクレオチド余分に伸張り、元の tRNA 分子と電気泳動的に分離できるようにした標識効率のアセスメントステップを組み込んだ点が優れたところであり、これによって正確な絶対定量が可能となった。さらに、永井氏は OTTER 法を *S. cerevisiae* に適用することで、isoacceptor レベルでの tRNA レパートリーの幅や、培養条件による変化について詳細なデータを得ることに成功した。特にこの中で、同じアミノ酸をデコードする isoacceptor tRNA 間で minor tRNA と major tRNA では発酵条件と呼吸条件とで比較すると増減の傾向が逆転しており、呼吸条件では minor tRNA の寄与が大きくなるなど、積極的な tRNA レパートリーの制御を示唆する現象も見出している。また、tRNA 量調節の重要な制御点である転写については、CRISPRi システムを用いて tRNA 遺伝子プロモーター活性をレポータータンパク質の発現抑制の度合いで見積もる手法の構築を行い、一定の成功を収めている。このように永井氏は、tRNA レパートリーの理解に不可欠な tRNA 絶対定量法と tRNA プロモーター活性の分析手法という解析技術面で tRNA 研究の展開に重要な貢献をしており、本学位論文の学術的価値の高さが認められる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、2021 年 4 月 17 日、論文内容およびこれに関連する事項について諮問を行った結果、合格と判定した。

博士論文審査報告書

論文題目：Analysis of quantitative regulation of individual tRNA species to maintain the tRNA repertoire
「tRNA レパートリーを形成する tRNA 種毎の量的制御機構の解析」

申請者： 永井 陽久

1. 論文内容の要旨

mRNA におけるコドンの選択と tRNA の供給は、プロテオームの形成を左右する重要な翻訳パラメーターである。以前、個々の tRNA 種の量はそれらをコードする遺伝子の数には左右されるものの、生物の一生を通じて大きくは変化しないと考えられてきた。しかし、近年の研究によって tRNA の発現パターン (tRNA レパートリー) は、細胞内外の環境によって変化することが明らかとなっていった。こうした事実は、サイトゾル中の tRNA 濃度を正しく測定することの重要性を改めて示すものとなった。microarray や RNA-seq といった網羅的な RNA 解析手法は、個々の tRNA 種の量が細胞を巡る環境変化でどう変わるかを知るには有用である。しかし、これらの手法は、各 tRNA 種がどれほどの効率でシグナルを生むかのアセスメントができないため、異なる tRNA 種間の量比を正しく見積もるには不向きである。従って、tRNA レパートリーを完全に理解するためには、十分な RNA 種分解能を持ち、かつ、信頼できる tRNA 絶対定量法を新たに開発する必要がある。さらに、環境変化に伴う tRNA レパートリーの変化が積極的な制御に基づくならば、tRNA の合成、即ち、転写は重要な制御点である。しかし、RNA polymerase II で転写される mRNA の場合と異なり、RNA polymerase III で転写される tRNA 遺伝子の転写制御に関しては、いわゆるレポーター系の構築が難しく、研究が進んでいなかった。このように、tRNA レパートリーの理解のためには、技術的に解決すべき問題が複数存在していた。

本学位論文で申請者は、こうした tRNA レパートリーの研究において、新規解析手法の開発という側面から取り組んだ。まず、申請者は Oligonucleotide-directed Three-prime Terminal Extension of RNA 法 (OTTER 法) という新規の tRNA 絶対定量法を開発した。この方法はアンチコドンで分類される tRNA (isoacceptor tRNA) レベルの種分解能で、tRNA 分子を特異的に蛍光標識・定量する手法である。標識された tRNA 分子は元の tRNA より伸張されるので、標識反応後のサンプルを northern blotting で分析することで標識効率を個々に評価することができる点が、この手法の特色である。申請者はこの手法を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に適用し、42 種類存在するサイトゾルの tRNA を 34 の個別 isoacceptor tRNA と 4 組の同じアミノ酸に対応した isoacceptor tRNA ペアの合算として定量できる条件を整え、いくつかの生理的生育条件下においてその絶対量を測定した。この手法により、標準的な *S. cerevisiae* 用の培地である YPD 中で対数増殖期まで培養した出芽酵母は、 0.030 ± 0.002 pmol/ μ g RNA から 0.728 ± 0.044 pmol/ μ g RNA の幅の isoacceptor tRNA を含むことを明らかにした。また、培地の炭素源や培養ステージによって出芽酵母の tRNA レパートリーが isoacceptor tRNA レベルで制御されている可能性等を見出した。

次に申請者はこうした tRNA レパートリー形成の要となる tRNA 種毎の転写制御を解析する手法の開発に取り組んだ。tRNA 遺伝子は内部プロモーターを持ち、転写後の修飾過程に至るまで mRNA 遺伝子とは大きく異なる。従って、単に tRNA 遺伝子にレポータータンパク質の遺伝子を融合することで tRNA のプロモーター活性を調べることはできない。そこで、申請者は CRISPRi システムを用いて、tRNA プロモーター活性を測定する手法の開発に取り組んだ。CRISPRi では、標的遺伝子を認識する sgRNA とこの sgRNA と結合して RNA polymerase 等の働きを阻害する dCas9 タンパク質が協働する事で、標的遺伝子の

転写が抑制される。申請者は、 β -galactosidase 遺伝子を標的とする sgRNA を tRNA 遺伝子の 3'末端に結合した融合遺伝子を作成し、tRNA プロモーターの強さを、この sgRNA の発現量で決まる β -galactosidase 遺伝子の転写抑制で見積もる系を開発した。実際、sgRNA の発現度合いにある程対応した β -galactosidase 活性の低下、即ち、レポーターの転写抑制が見られることを明らかにし、tRNA プロモーターの強さの定量解析に道を拓いた。なお、本論文中的新規 tRNA 絶対定量法の開発・応用の部分は、国際 RNA 学会の学会誌 *RNA* に掲載された [Nagai, A., Mori, K., Shiomi, Y., and Yoshihisa, T. (2021) OTTER, a new method quantifying absolute amounts of tRNAs. *RNA*, 27: 628-640. doi: 10.1261/rna.076489.120]。

2. 論文審査結果

tRNA は長らく存在量があまり変化しないハウスキーピング因子だと考えられていたが、近年の研究でそのレパートリーが細胞の内的・外的環境に応じて変化することが明らかとなってきた。こうした研究では microarray や RNA-seq 等といった網羅的 RNA 解析手法が利用されてきたが、現在でも tRNA 種間で測定手法のシグナル生成に対するバイアスが大きいこと、さらには、個々の tRNA 種の測定におけるバイアスの強さを正確に評価し難いことは問題視されている。永井陽久氏はこうしたことから、tRNA レパートリーの真の姿を明らかにする目的で、新規な tRNA の絶対定量法の開発に取り組み、OTTER 法の確立を成し遂げた。OTTER 法は、tRNA を reverse primer extension によって蛍光標識する際に数ヌクレオチド余分に伸張し、元の tRNA 分子と電気泳動的に分離できるようにした標識効率のアセスメントステップを組み込んだ点が優れたところであり、これによって正確な絶対定量が可能となった。さらに、永井氏は OTTER 法を *S. cerevisiae* に適用することで、isoacceptor レベルでの tRNA レパートリーの幅や、培養条件による変化について詳細なデータを得ることに成功した。特にこの中で、同じアミノ酸をデコードする isoacceptor tRNA 間で minor tRNA と major tRNA では発酵条件と呼吸条件とで比較すると増減の傾向が逆転しており、呼吸条件では minor tRNA の寄与が大きくなるなど、積極的な tRNA レパートリーの制御を示唆する現象も見出している。また、tRNA 量調節の重要な制御点である転写については、CRISPRi システムを用いて tRNA 遺伝子のプロモーター活性をレポータータンパク質の発現抑制の度合いで見積もる手法の構築を行い、一定の成功を収めている。このように永井氏は、tRNA レパートリーの理解に不可欠な tRNA 絶対定量法と tRNA プロモーター活性の分析手法という解析技術面で tRNA 研究の展開に重要な貢献をしており、本学位論文の学術的価値の高さが認められる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、2021 年 4 月 17 日、論文内容およびこれに関連する事項について諮問を行った結果、合格と判定した。

主査 : 吉田 秀郎



副査 : 西谷秀男



: 吉久 徹



: 今高 寛晃



(兵庫県立大学大学院工学研究科)